

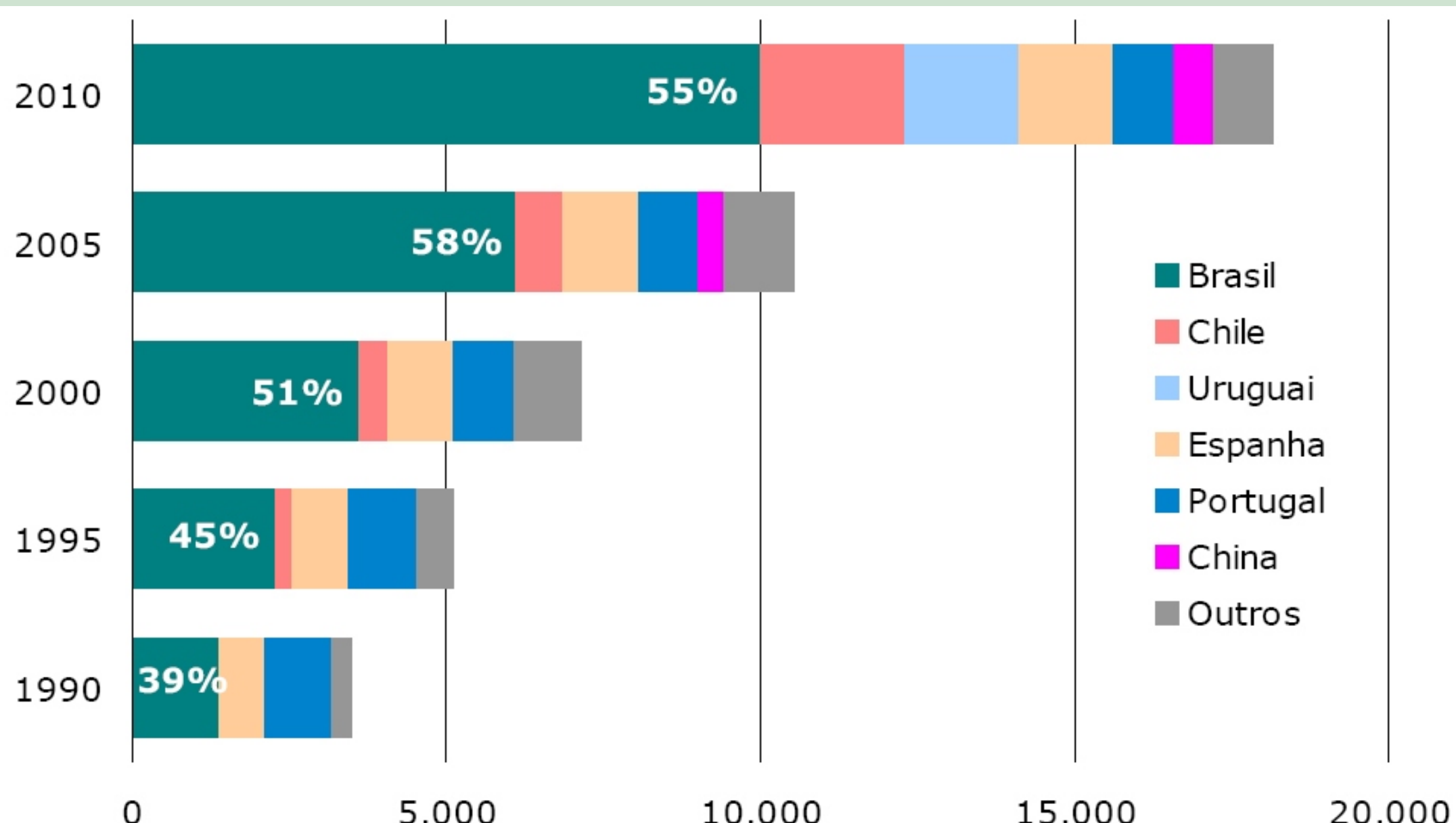
Avaliação do efeito da superexpressão do gene *EgCesA3* de *Eucalyptus* em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*



Marques, W.L.*; Salazar, M.M.; Camargo, E.L.O.; Lepikson-Neto, J. & Pereira, G.A.G
 Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
 *Imarques@lge.ibi.unicamp.br

Introdução

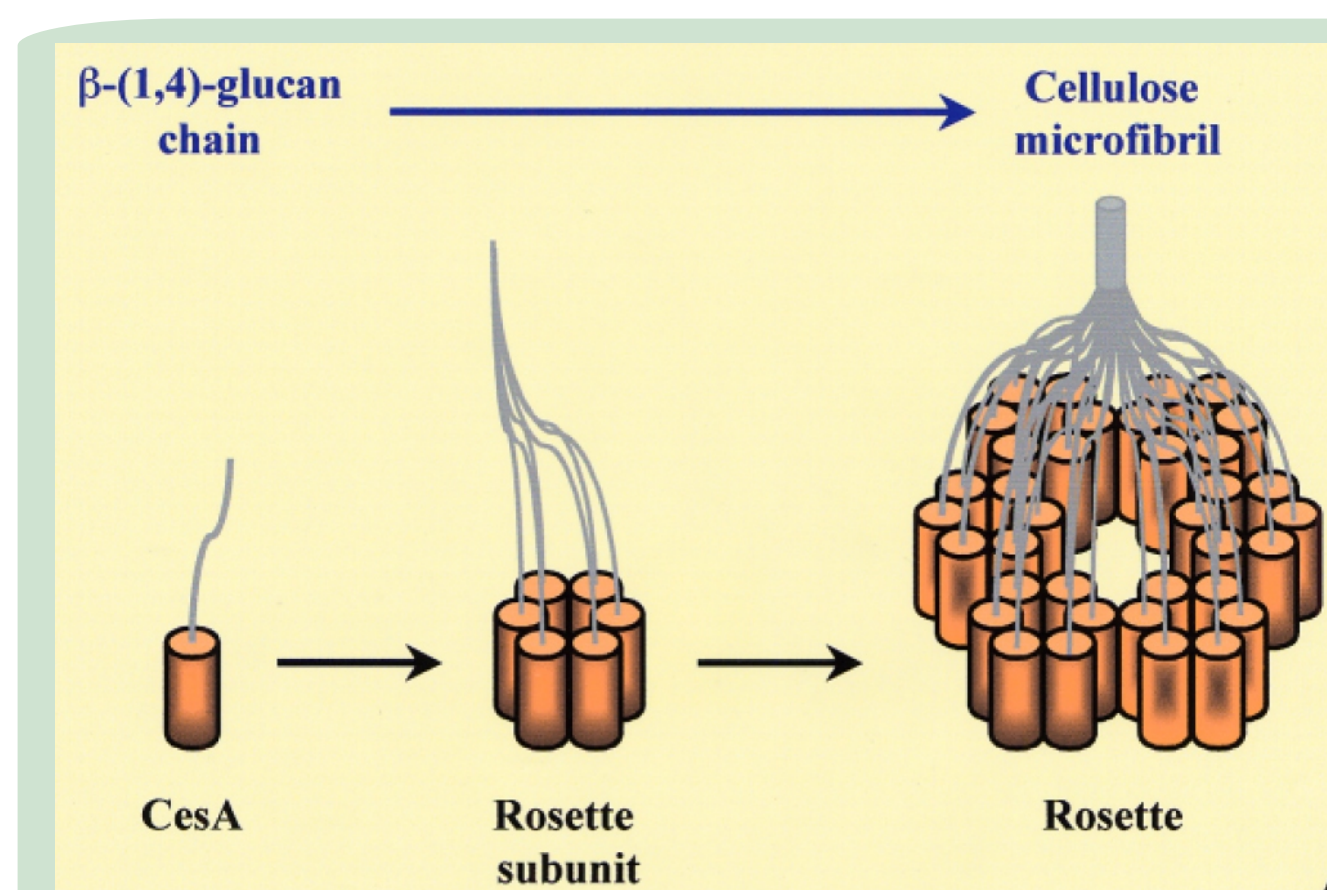
- O setor florestal contribui com 4,5% do PIB brasileiro;
- O Brasil é o maior produtor/exportador de celulose de fibra curta (obtida de eucalipto);
- O eucalipto é a principal fonte do setor de papel e celulose pois apresenta crescimento rápido, alta produtividade (cerca de 41 m³/ha/ano, no Brasil) e boa resposta a tratamentos culturais de manejo e melhoramento genético.



Brasil: líder na produção de celulose de eucalipto. Adaptado de PPPC (Pulp and Paper Products Council, 2009)

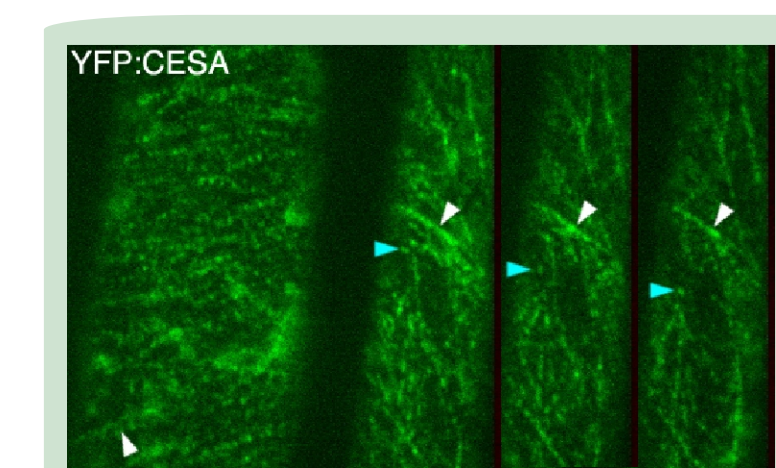
- O objetivo desse trabalho é superexpressar um importante gene relacionado com a síntese de celulose em *Arabidopsis thaliana* e em *Nicotiana tabacum* esperando-se aumento no teor de celulose e na velocidade de crescimento vegetal. Para avaliar o fenótipo serão realizadas análises químicas (HPLC) e histológicas.

- O gene escolhido para a superexpressão foi o *EgrCesA3* (*Eucalyptus grandis* Celulose Sintase 3) pois:
 - ▶ é um dos mais expressos em xilogênese;
 - ▶ quando nocauteado, a parede dos elementos de vaso ficam delgadas e a planta não se sustenta verticalmente.



O gene *EgrCesA3* codifica para uma proteína de membrana que, por sua vez, faz parte de um complexo celulose sintase de um total de 36 dessas proteínas. Cada uma delas sintetiza uma cadeia elementar de celulose na face exterior da membrana plasmática a partir de resíduos de UDP-glicose intracelulares.

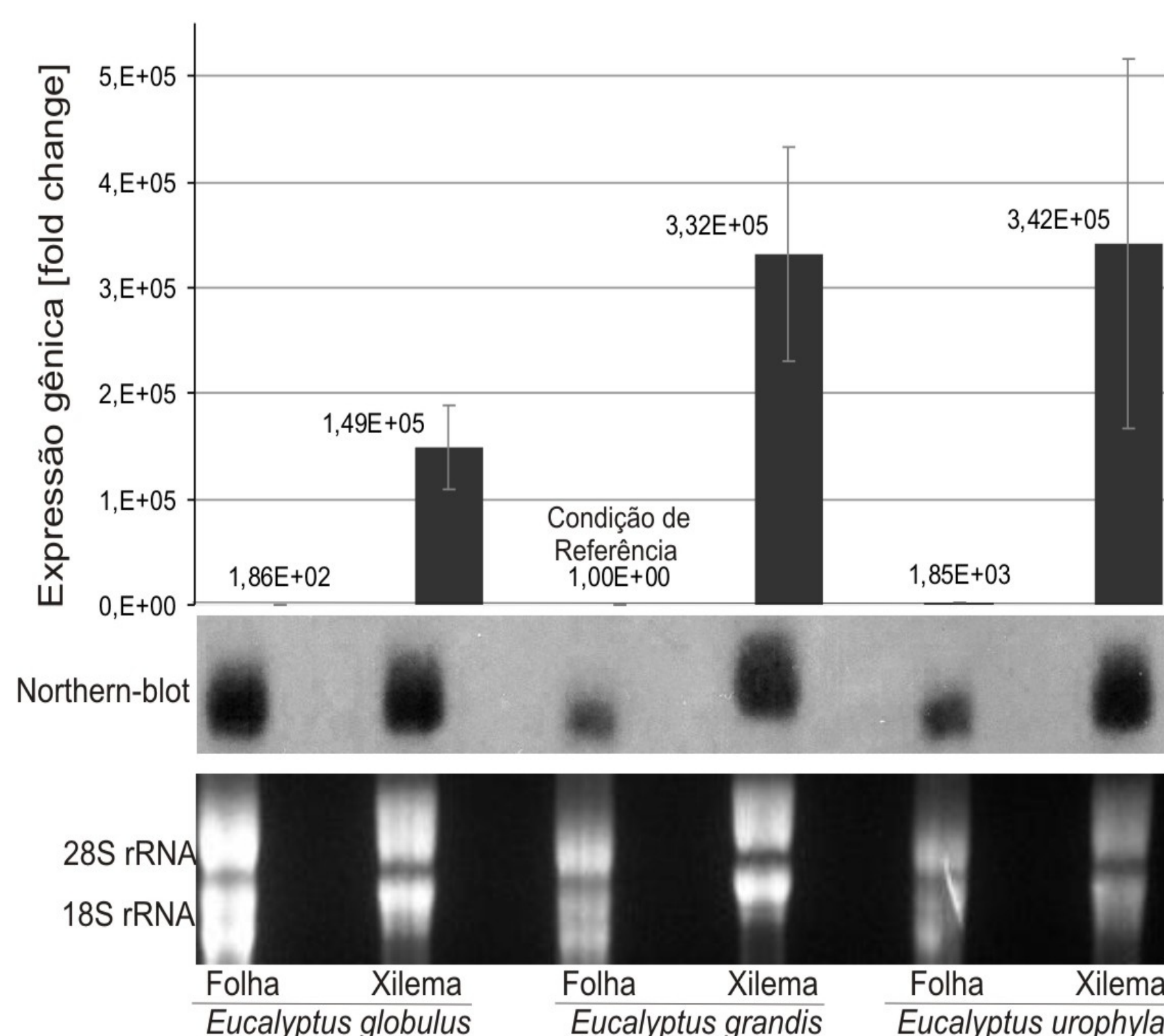
▶ Eletromicrografia do complexo celulose sintase.
DOBLIN, et al, 2002



O complexo celulose sintase se movimenta na membrana plasmática deixando uma fibra de celulose no caminho.

Veja na imagem à esquerda um complexo marcado com YFP se movimentando (setas azuis).
Alexander R. Paredez, et al. 2006

Perfil de expressão gênica

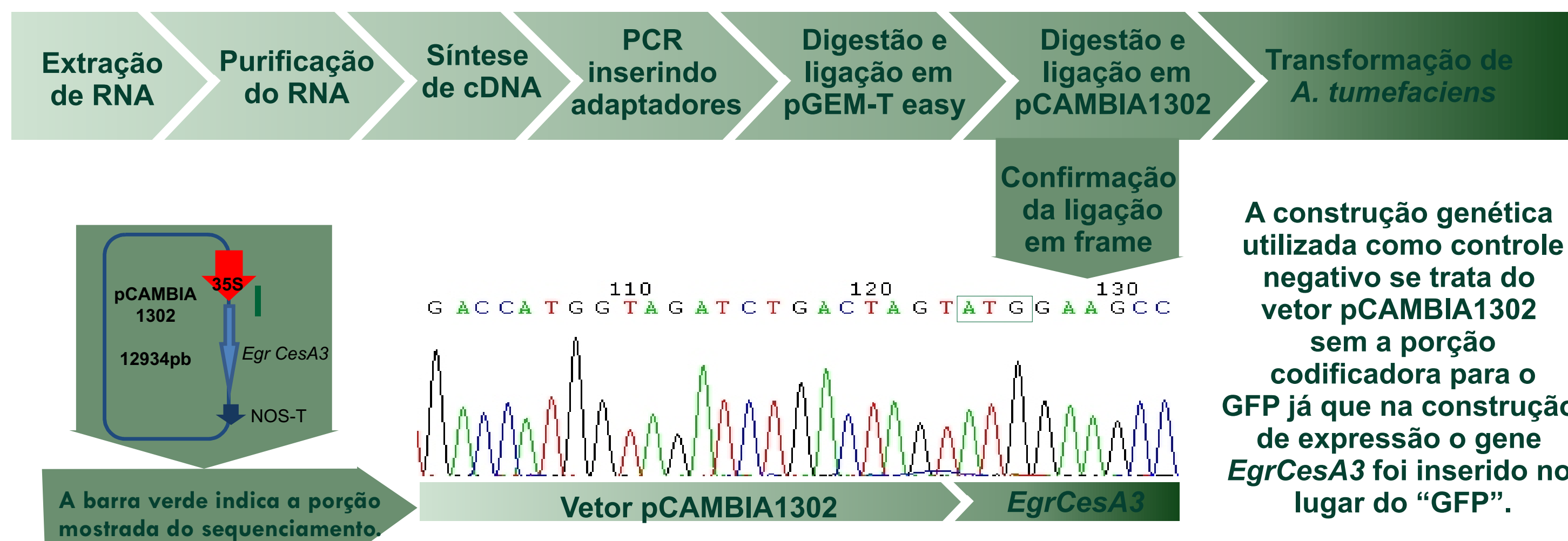


- O gene *CesA3* é mais expresso em xilema do que em folha em três espécies mais relevantes para o cenário brasileiro. Esse dado corrobora para a teoria de que o gene *CesA3* atua apenas na formação de parede celular secundária (xilogênese).

- Em xilema, não existe diferença significativa entre a expressão do *CesA3* comparando-se as três espécies em questão o que vai de encontro ao fato de que o teor de celulose da madeira das três espécies em questão é semelhante.

- Vale citar que apenas a amostra "folha de *E. Globulus*" não pôde ser avaliada pelo northern devido à diferença de RNA utilizado.

Clonagem



Obtenção de plantas transgênicas

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana (wt Col-0) foi cultivada em casa de vegetação por 30 dias.

As hastes florais foram então cortadas estimulando a brotação das gemas. Com isso obtém-se maior número de botões florais do que antes além de sincronizar a floração dos indivíduos.

Com hastes entre 2 e 10cm as plantas foram borrifadas com solução de sacarose contendo *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com a construção de superexpressão do gene *EgrCesA3*.

As sementes transformadas estão sendo coletadas para germinação/seleção em meio com o antibiótico adequado.

Nicotiana tabacum

Sementes de *N. tabacum* (wt) germinaram em meio livre de contaminantes.

Em seguida foram transferidas para tubetes maiores.

A. tumefaciens foi co-cultivada com explantes de *N. tabacum* dos quais surgiram calos.

Os calos foram transferidos para o meio de regeneração a fim de se obter plântulas transgênicas.

Conclusão

- O gene *EgrCesA3* é igualmente expresso na xilogênese das três espécies de eucalipto mais relevantes no mercado brasileiro e sua baixa expressão em folha foi reafirmada nesse estudo;
- A clonagem do gene em questão em vetor binário para superexpressão em plantas modelo foi realizada;
- Plantas transgênicas para o gene *EgrCesA3* foram obtidas e estão em fase de "avanço de gerações" para a posterior avaliação fenotípica.

Referências

BOUDET, A.M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocelluloses: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant science*. V. 12(8), p. 576-81. 2003.

BROWN, D. M.; ZEEF, L. A. H.; ELLIS, J. GOODACRE, R. & TURNER, S. R. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *The plant cell*. V. 17, p. 2281 - 2295. 2005

DIOTALLEVI, F.; MULDER, B. The Cellulose Synthase Complex: A Polymerization Driven Supramolecular Motor. *The Netherlands Biophysical Journal*. V. 92, p. 2666-2673p. 2007.

DOBLIN, M.S., KUREK, I., DELMER, D.P., JACOB-WILK, D., Cellulose Biosynthesis in Plants: from Genes to Rosettes. *Plant and Cell Physiology*. V. 43(12), p. 1407-1420. 2002.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*. V. 29, p. 2002 - 2007. 2001.

Alexander R. Paredez, et al. Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with Microtubules. *Science* 312, 1491. 2006.

PPPC- Pulp and Paper Products Council. <Disponível em http://www.pppc.org/en/1_0/index.html>. Acessado em 20 de julho de 2009

RANKIN, M. & MYBURG, A. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. *Tree Physiology*. V. 26, p. 545 - 556. 2006.